

„kleben“. Möglicherweise nutzen die Zellen die beobachteten Oberflächenstrukturen also sowohl zur Adsorption an Siloxan-Tropfen (Abb. 14 D) als auch zur Aggregation. In der extrem lange andauernden Fermenter-Kultur wurden vereinzelt auch Zellen einer stäbchenförmigen Kontaminante beobachtet, die ebenfalls sehr auffällige Oberflächenstrukturen aufweist (Abb. 14 F). Um welches Bakterium es sich hierbei handelt, konnte wegen des seltenen Auftretens nicht bestimmt werden.

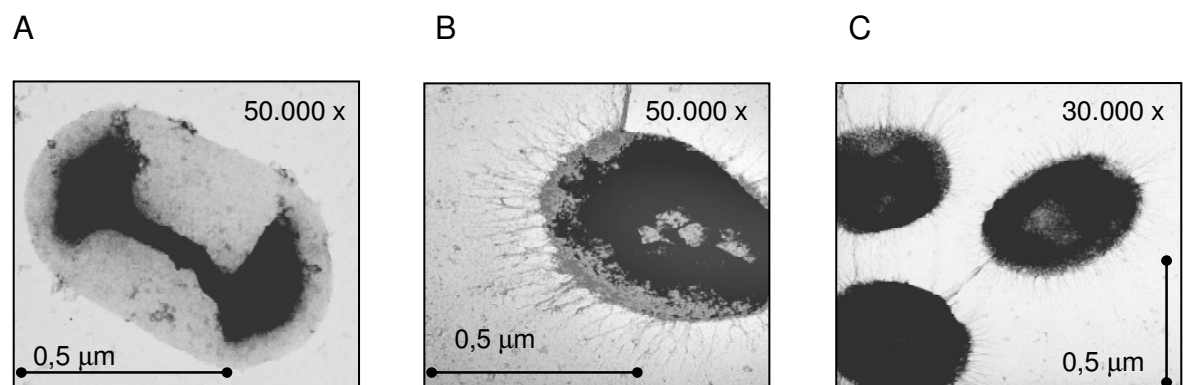


Abbildung 13: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Paracoccus* sp. IO-1 während des Wachstums mit A Acetat und B, C Siloxan D5 als Substrat.

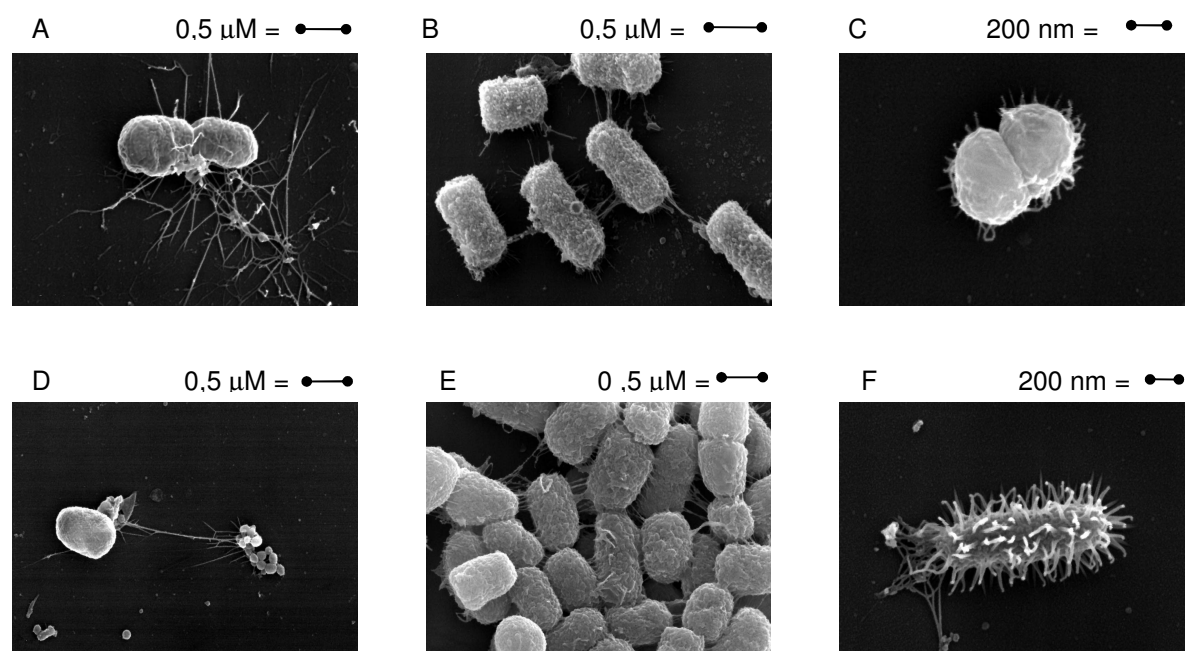


Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Paracoccus* sp. IO-1 auf verschiedenen Substraten (Prof. Wanner, LMU München). A und B Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1 unter denitrifizierenden Bedingungen mit Acetat als Substrat, C, D und E Anzucht von *Paracoccus* sp. IO-1 im Fermenter unter denitrifizierenden Bedingungen mit dem Siloxan D5 als Substrat und F selten auftretende Kontaminante unter denitrifizierenden Bedingungen mit D5 als Substrat (Kap. IV, 2.6)

2.3 Wachstumsversuche mit momomeren Siliconöl-Modellverbindungen als Substrate – Substratspektrum

Um einen Überblick über den Silanol-abhängigen Nitratverbrauch von *Paracoccus* sp. IO-1 und *Ochrobactrum* sp. Si-1 zu bekommen, wurden noch weitere Siliconöle und Substanzen (DMSO, Methanol und *tert*-Butanol) als Substrate getestet. Zusätzlich wurde noch ein weiterer Stamm der Gattung *Paracoccus*, *Paracoccus denitrificans* PD 1222, auf die Fähigkeit getestet, unter denitrifizierenden Bedingungen mit Siliconölen bzw. Silanolen und Siloxanen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen zu können. Stamm PD 1222 wurde ausgewählt, da sein Genom bereits vollständig sequenziert ist und frei zugänglich vorliegt, so dass Vergleiche auch auf genetischer Ebene möglich sind (Kap. IV, 6). Die Bakterien wurden als Flüssigkulturen in anaerobem Grundmedium I (Kap. III, 3.1.1) angezogen. Die Anfangskonzentration an Nitrat betrug jeweils 2 mM. Dabei variierte die Substratkonzentration (Tab. 57) je nach Löslichkeit der Substrate in Wasser. Die Ansätze wurden mit je 1 % (v/v) einer Vorkultur auf Acetat (für die Ansätze mit DMSO, Methanol und *tert*-Butanol) oder M3 bzw. D5 beimpft. Bei allen drei getesteten Stämmen wurde der Nitratverbrauch in Abhängigkeit von den zugegebenen Substraten über einige Wochen verfolgt. Nitrat wurde dabei nur in solchen Ansätzen verbraucht, die Siliconöl, Siliconöl-Modellverbindungen oder ein anderes Substrat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten. Die Kulturen mit zugegebenen Siliconöl-Modellverbindungen zeigten trotz messbarer Nitratreduktion keine Zunahme der Optischen Dichte. Jedoch hefteten sich die Zellen von *Paracoccus* sp. IO-1 während des Wachstums mit dem wasserunlöslichen Siliconöl M50 und dem Siloxan D5 sichtbar an die organische Phase an (Kap. IV, 2.1).

Tabelle 57: Siliconöle, Siloxane, Silanole und weitere Substanzen, die als Energie- und Kohlenstoffquellen für die Stämme *Paracoccus* sp. IO-1, *Paracoccus denitrificans* PD 1222 und *Ochrobactrum* sp. Si-1 getestet wurden. Jedes Substrat wurde mindestens zweimal in den angegebenen Konzentrationen getestet. Schlecht wasserlösliche Verbindungen wurden als organische Phase zugegeben. Alle Ansätze wurden unter Schütteln inkubiert, um einen besseren Übergang der Substrate in die Wasserphase zu erlauben und den Bakterien den größtmöglichen Kontakt zum Substrat zu ermöglichen. +: gutes Wachstum innerhalb von mehreren Wochen bis Monaten, (+): Nitratreduktion messbar, aber keine Zunahme der OD, -: kein Wachstum und keine Nitratreduktion, n.b.: nicht bestimmt.

Substrat	<i>Paracoccus</i> sp. IO-1	<i>Paracoccus</i> PD 1222	<i>Ochrobactrum</i> sp. Si-1
DMSD (1 mM)	(+)	-	(+)
M3 (1 mM)	(+)	n.b.	(+)
D5 (1 %)	+	-	n.b.
M50 (1 %)	+	n.b.	n.b.
DMSO (1 mM)	+	n.b.	n.b.
Methanol (1 mM)	(+)	-	n.b.
<i>tert</i> -Butanol (1 mM)	-	-	n.b.
Kontrolle (ohne Substrat)	-	-	-

Bei *Paracoccus* sp. IO-1 wurde ein Nitratverbrauch mit den Siliconöl-Modellverbindungen DMSD, M3, D5 und dem Siliconöl M50, mit DMSO und Methanol beobachtet. Kein Nitratverbrauch wurde dagegen mit *tert*-Butanol festgestellt. Der Genom-sequenzierte *Paracoccus denitrificans* Stamm PD 1222 zeigte dagegen keine Siloxan (D5)- oder Silanol (DMSD)-abhängige Nitratreduktion. Ebenso verwertete dieser Stamm anscheinend weder Methanol noch *tert*-Butanol. Der neu isolierte Stamm *Ochrobactrum* sp. Si-1 zeigte Nitratreduktion in Abhängigkeit von DMSD und M3.

2.4 NaHCO₃-Abhängigkeit bei Wachstumsversuchen von *Paracoccus* sp. IO-1 und *Ochrobactrum* sp. Si-1 auf DMSD

Als Standardmedium für die Anzucht der Bakterien mit Silanolen und Siloxanen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wurde Grundmedium I (Kap. III, 3.1.1) verwendet. Um die optimale Menge an CO₂ bzw. NaHCO₃ zu bestimmen, die notwendig ist, damit die Bakterien abhängig vom anwesenden Silanol/Siloxan noch Nitrat verbrauchen, wurde Grundmedium I mit 1 mM DMSD bzw. M3 mit verschiedenen Konzentrationen NaHCO₃ supplementiert (0 mM, 2 mM, 10 mM und 40 mM) und nach dem Beimpfen der Nitratverbrauch

beobachtet (Abb. 15). Beispielhaft wird im Folgenden die NaHCO_3 -Abhängigkeit nur für die Kultur von *Paracoccus* sp. IO-1 beim Wachstum mit DMSD beschrieben, da dieselbe NaHCO_3 -Abhängigkeit auch bei Kulturen von *Paracoccus* sp. IO-1 mit M3 und bei Kulturen von *Ochrobactrum* sp. Si-1 mit DMSD und M3 festgestellt wurde.

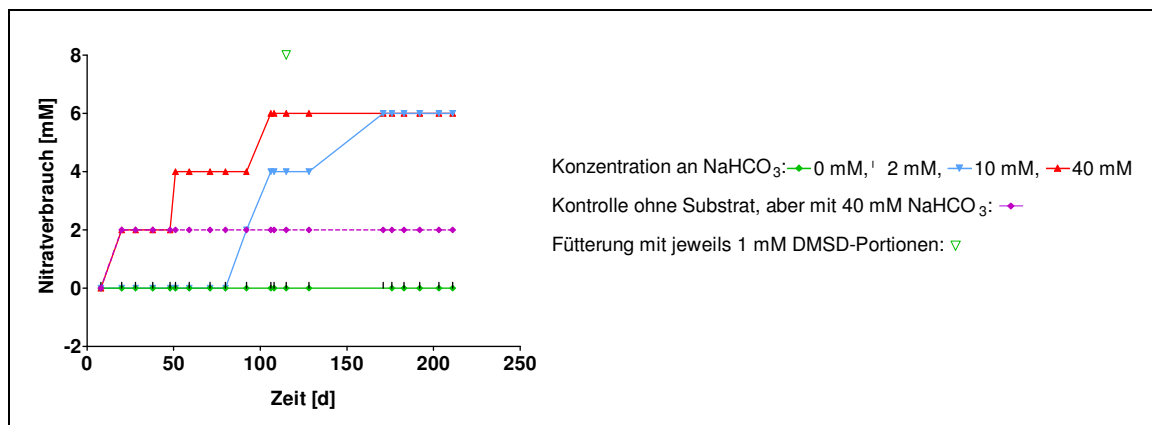


Abbildung 15: Wachstumsprotokolle zur NaHCO_3 -Abhängigkeit von *Paracoccus* sp. IO-1 mit DMSD als Substrat. Dargestellt ist der Nitratverbrauch in Abhängigkeit von der Zeit [d]. Hatte die jeweilige Kultur die vorgelegte Portion von 2 mM Nitrat verbraucht, so wurde sie mit Portionen von je 2 mM Nitrat nachgefüllt; hieraus ergibt sich das Stufenschema. Jeder Ansatz enthält zusätzlich NaHCO_3 in einer Konzentration von 0 mM, 2 mM, 10 mM oder 40 mM.

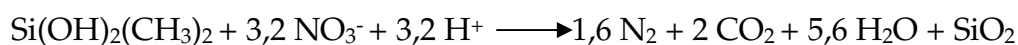
Enthielten die Ansätze kein oder nur 2 mM NaHCO_3 , wurde während einer Inkubationszeit von 211 Tagen kein Nitratverbrauch gemessen. In den Versuchsansätzen mit 10 mM NaHCO_3 hatten die Bakterien nach 211 Tagen 6 mM Nitrat verbraucht, jedoch dauerte es 92 Tage, bis die ersten 2 mM Nitrat reduziert waren. Die Kultur mit 40 mM NaHCO_3 hatte 2 mM Nitrat dagegen schon nach 20 Tagen verbraucht und nach 211 Tagen insgesamt 6 mM Nitrat umgesetzt. Anscheinend konnte die Kultur mit 40 mM NaHCO_3 schneller DMSD-abhängig Nitrat reduzieren, während der gesamten Zeit allerdings nicht mehr. Bei der Kontrolle, die zwar NaHCO_3 , aber kein DMSD enthielt, konnte nach 20 Tagen ein Nitratverbrauch von 2 mM festgestellt werden, der auf das mit dem Inokulum übertragene Substrat zurückzuführen ist. Nach Verbrauch dieses restlichen Substrates reduzierte die Kultur auch kein Nitrat mehr. Für die weiteren Versuche wurde als Standardmedium Grundmedium I verwendet, dem 40 mM NaHCO_3 zugesetzt wurde.

2.5 Acetat-Abhängigkeit bei Wachstumsversuchen von *Paracoccus* sp. IO-1 auf DMSD und Methanol

Bei Kulturen, die Silanol- bzw. Siloxan-abhängig Nitrat verbrauchten, wurde während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine Zunahme der Optischen Dichte gemessen. Ich vermute daher, dass die Methylgruppen der Siloxane eventuell nur für den Energiestoffwechsel genutzt, aber nicht in Zellmasse assimiliert werden. Um die Ausbeute an Zellmasse bei Anzuchten mit Silanolen, Siloxanen und Siliconölen zu erhöhen, wurden die Kulturen deshalb mit unterstöchiometrischen Mengen an Acetat gefüttert, das für die Synthese von Zellmasse verwendet werden kann. Beispielhaft wird im Folgenden die Acetat-Abhängigkeit nur für die Kultur von *Paracoccus* sp. IO-1 beim Wachstum mit DMSD und Methanol beschrieben, da dieselbe Acetat-Abhängigkeit auch bei Kulturen von *Paracoccus* sp. IO-1 mit M3 und bei Kulturen von *Ochrobactrum* sp. Si-1 mit DMSD und M3 festgestellt wurde.

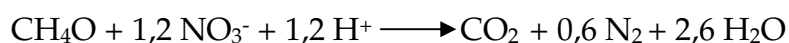
Zunächst wurden die theoretischen Stöchiometrien zwischen verbrauchtem Substrat zu benötigtem Elektronenakzeptor berechnet:

1. vollständige Oxidation des DMSD zu CO₂ unter denitrifizierenden Bedingungen:



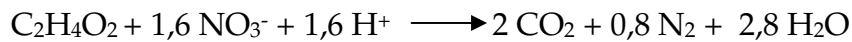
DMSD : NO₃⁻ = 1 : 3,2 (wenn die Methylgruppen aus dem DMSD nicht zu Biomasse assimiliert werden)

2. vollständige Oxidation von Methanol zu CO₂ unter denitrifizierenden Bedingungen:



Methanol : NO₃⁻ = 1 : 1,2 (wenn die Methylgruppe aus dem Methanol nicht zu Biomasse assimiliert wird)

3. vollständige Oxidation von Acetat zu CO₂ unter denitrifizierenden Bedingungen:



- a) Acetat : NO₃⁻ = 1: 1,6 (wenn die Methylgruppe aus dem Acetat nicht zu Biomasse assimiliert wird)
- b) Wird die Methylgruppe zu Biomasse assimiliert, ergibt sich eine Stöchiometrie von Acetat: NO₃⁻ = 1 : 1

Aus den Reaktionsstöchiometrien kann gefolgert werden, dass bei Zufütterung von 200 µM Acetat zu einer Kultur mit 1 mM DMSD die Menge des maximal reduzierten Nitrats lediglich um 6 % ansteigt (wenn Acetat zu Biomasse assimiliert wird; vgl. die theoretische Stöchiometrie von Acetat : NO₃⁻). Um zu bestimmen, ob die Silanol-abhängige Nitratreduktion durch Acetat gesteigert werden kann, wurde zu Kulturen auf DMSD (1 mM) oder Methanol (10 mM) jeweils Acetat in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (0 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM und 300 µM) und die Kinetik der Nitratreduktion verfolgt.

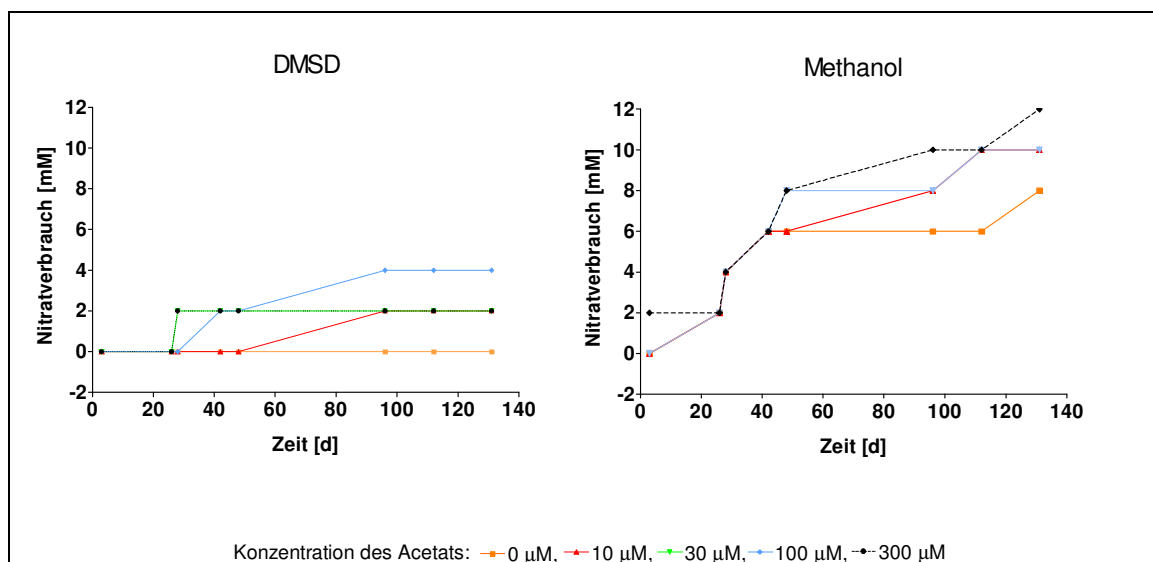


Abbildung 16: Wachstumsprotokolle zur Acetat-Abhängigkeit bei Wachstumsversuchen von *Paracoccus* sp. IO-1 mit DMSD oder Methanol als Substrat. Dargestellt ist der Nitratverbrauch [mM] in Abhängigkeit von der Zeit [d]. Hatte die jeweilige Kultur die vorgelegte Portion von 2 mM Nitrat verbraucht, so wurde sie mit Portionen von je 2 mM Nitrat nachgefüttert; hieraus ergibt sich das Stufenschema. Jeder Ansatz enthält zusätzlich zum eigentlichen Substrat noch Acetat in einer Konzentration von 0 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM oder 300 µM.

DMSD als Substrat: In Ansätzen von *Paracoccus* sp. IO-1 mit DMSD als Substrat und ohne zusätzliche Zugabe von Acetat (Abb. 16) wurde keine Nitratreduktion gemessen. Bei Ansätzen, die zusätzlich 10 oder 30 μM Acetat enthielten, wurden nach insgesamt 131 Tagen 2 mM Nitrat verbraucht. Die Nitratreduktion war dabei umso schneller, je mehr Acetat im Ansatz war. Bei Zugabe von 100 μM Acetat wurden nach 131 Tagen 4 mM verbraucht, und eine Zugabe von 300 μM Acetat schien den Nitratverbrauch nicht weiter zu steigern. Die letztere Kultur hatte nach 28 Tagen schon die erste Portion Nitrat von 2 mM verbraucht, jedoch konnte während des weiteren Versuches auch nach 131 Tagen keine weitere Nitratreduktion gemessen werden. Der Vergleich der theoretischen Stöchiometrien von $\text{DMSD} : \text{NO}_3^-$ und $\text{Acetat} : \text{NO}_3^-$ mit dem tatsächlich reduzierten Nitrat (Tab. 58) zeigt, dass der Nitratverbrauch nicht allein auf die Oxidation des Acetats zurückgeführt werden kann.

Tabelle 58: Theoretische Stöchiometrie zwischen Substrat und dem benötigten Elektronenakzeptor Nitrat. Gezeigt ist die theoretische Stöchiometrie, die Konzentration des Substrates, der tatsächlich gemessene Nitratverbrauch und der theoretische Nitratverbrauch. Der theoretische Nitratverbrauch ergibt sich aus der theoretischen Stöchiometrie und der Konzentration an Substrat in der Kultur. Für Acetat wurde die theoretische Stöchiometrie angegeben, unter der Annahme, dass Acetat zu Biomasse assimiliert wird.

	theoretische Stöchiometrie	Konzentration des Substrates	tatsächlicher Nitratverbrauch insgesamt	theoretischer Nitratverbrauch
DMSD	DMSD: $\text{NO}_3^- = 1 : 3$	1 mM		3 mM
Acetat	Acetat : $\text{NO}_3^- = 1 : 1$	100 μM	4 mM	100 μM
Methanol	Methanol : $\text{NO}_3^- = 1 : 1$	10 mM		10 mM
Acetat	Acetat : $\text{NO}_3^- = 1 : 1$	300 μM	12 mM	300 μM

Methanol als Substrat: In Kontrollkulturen auf Methanol wurde der Nitratverbrauch bereits unabhängig von der Zugabe von Acetat gemessen (Abb. 16). Allerdings wurde auch hier eine Steigerung nach Zugabe von Acetat festgestellt. Eine Kultur ohne Zugabe von Acetat zeigte nach 131 Tagen einen Nitratverbrauch von insgesamt 8 mM, während nach Zugabe von 10 μM bzw. 100 μM Acetat jeweils 10 mM Nitrat verbraucht wurden und mit 300 μM Acetat der Nitratverbrauch bis auf 12 mM gesteigert wurde.

Sowohl bei den Ansätzen mit DMSD, als auch bei denen mit Methanol ist die gemessene Steigerung der Nitratreduktion nicht durch die vollständige Oxidation des Acetats zu erklären, da überstöchiometrische Mengen an Nitrat verbraucht wurden. Die Reduktion des Nitrats muss also mit einer Oxidation von größeren Mengen von DMSD bzw. Methanol gekoppelt sein als in Abwesenheit von Acetat. In folgenden Wachstumsversuchen mit Siliconölen, Silanolen und Siloxanen wurde den Kulturen Acetat als Cosubstrat in einer Konzentration von 200 μM hinzugefügt, um den Nitratverbrauch zu steigern.

2.6 Wachstumsversuche mit D5 als Substrat

2.6.1 Wachstumsversuche im Fermenter

Da die Wachstumsversuche mit Silanolen (DMSD und M3) und Siloxanen (D5) als Substrate nie Zellmasse in ausreichenden Mengen für weitere Versuche

lieferten, wurde ein größerer Ansatz einer *Paracoccus* sp. IO-1-Kultur mit D5 als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in einem 5 l-Fermenter unter denitrifizierenden Bedingungen angezogen. Das Substrat D5 wurde in nicht limitierender Menge (50 ml D5 pro 5 l Medium) zugegeben und bildete eine wasserunlösliche Phase. Die Anfangskonzentration von Nitrat betrug 2 mM und zur Anregung des Baustoffwechsels wurden 200 μ M Acetat hinzugegeben. Insgesamt wurden zwei Fermenterkulturen angezogen (Tab. 59). Die erste (Fermenter I) wurde über 70 Tage angezogen und erst ab Tag 30 mit Acetat gefüttert. Nach 70 Tagen wurde eine OD von 0,1 gemessen, der Fermenter verbrauchte während der gesamten Zeit jedoch kein Nitrat. Anhand der Aufzeichnung des Sauerstoffpartialdruckes (Abb. 17) war jedoch zu erkennen, dass der Fermenter während des lange andauernden Versuches nicht ganz luftdicht zu halten war und Sauerstoff in den Fermenter diffundiert ist. Die Bakterien fanden im Fermenter also mikroaerobe Bedingungen vor, unter denen heterotrophe Nitrifikation stattfinden konnte. Wenn Nitrat dann durch die Nitratreduktase zu Nitrit reduziert wird, kann letzteres über die Atmungskette mit dem vorhandenen Sauerstoff wieder zu Nitrat rückoxidiert werden. Das Abernten von Fermenter I lieferte 400 mg Zellmasse und immerhin so viel Protein (2,4 μ g/ μ l), dass weitere Versuche zur Analyse Siloxan-induzierter Proteine durchgeführt werden konnten (Kap. IV, 2.6.1).

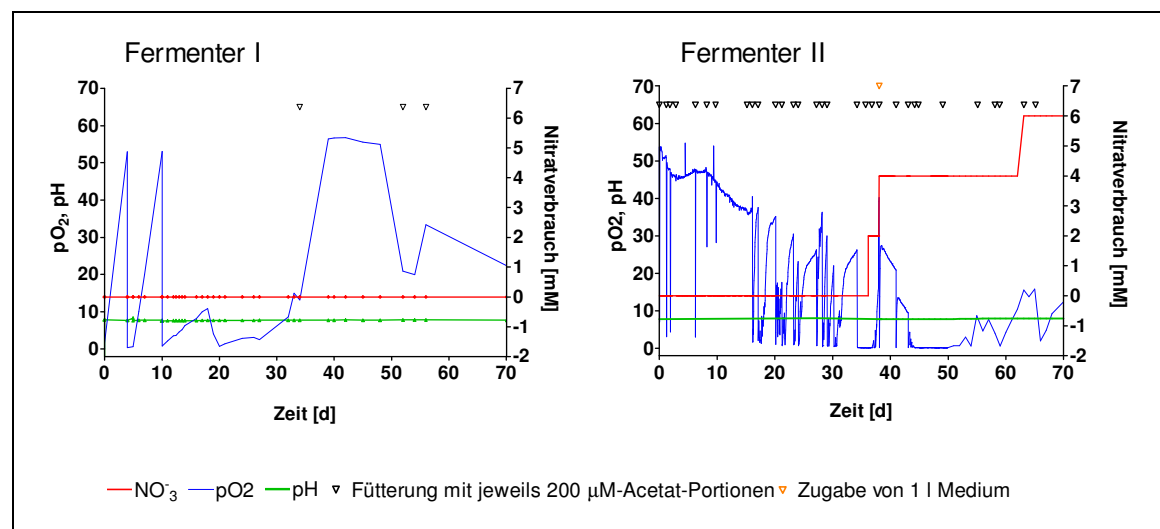


Abbildung 17: Wachstumsversuche von *Paracoccus* sp. IO-1 im 5 l-Fermenter mit D5 als Substrat. pO₂: Sauerstoffpartialdruck in % (Sättigung des Mediums in % in diesem geschlossenen System im Vergleich zu Medium, welches an der Luft Sauerstoff ausgesetzt wäre), pH: pH-Wert und der Nitratverbrauch [mM] in Abhängigkeit von der Zeit [d].

Die zweite Kultur (Fermenter II) wurde von Beginn an mit Acetat in mehreren Portionen von 200 μ M supplementiert, um die Ausbeute an Zellmasse zu steigern. Dabei wurde mit insgesamt 6,2 mM Acetat eine wesentlich höhere Menge zugesetzt als bei den sonstigen Supplementationsversuchen (Tab. 59). Auch bei diesem Fermenter diffundierte während des Wachstumsversuches Sauerstoff in das Gefäß, so dass auch hier keine strikt anaeroben Bedingungen herrschten. Durch die regelmäßige Zugabe von Acetat konnte der Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu Fermenter I jedoch deutlich niedriger gehalten werden. Nach 70 Tagen verbrauchte *Paracoccus* sp. IO-1 in diesem Fermenter 6 mM Nitrat, was jedoch hauptsächlich auf die Oxidation des Acetats zurückzuführen ist. Korrelierend hierzu stieg auch die OD auf 0,3 an. Die Ernte der Zellen und Analyse des Proteinmusters sollte im Weiteren Aufschluss darüber geben, ob auch unter diesen Bedingungen ähnliche D5-induzierte Proteine vorhanden sind wie in den Zellen aus Fermenter I.

Tabelle 59: Vergleich der Bedingungen während der Wachstumsversuche von *Paracoccus* sp. IO-1 im 5 l-Fermenter mit D5 als Substrat.

	Fermenter I	Fermenter II
Bedingungen	1 % D5, 2 mM NaNO ₃ , Inokulum von einer D5-Kultur, weitgehend anaerob	
Wachstum	70 d	70 d
Acetat-Fütterung	ab Tag 30, insgesamt 0,6 mM	von Beginn an, insgesamt 6,2 mM
NO₃-Verbrauch	0 mM	6 mM
OD	0,1	0,3

2.6.2 Proteinmustervergleich

Um einen ersten Einblick in das Proteinmuster von Siliconöl- bzw. Siloxan-induzierten Proteinen zu bekommen, wurden SDS-Polyacrylamid-Gele mit dem Gesamtprotein der Zellen aus den Fermenter I und II hergestellt.

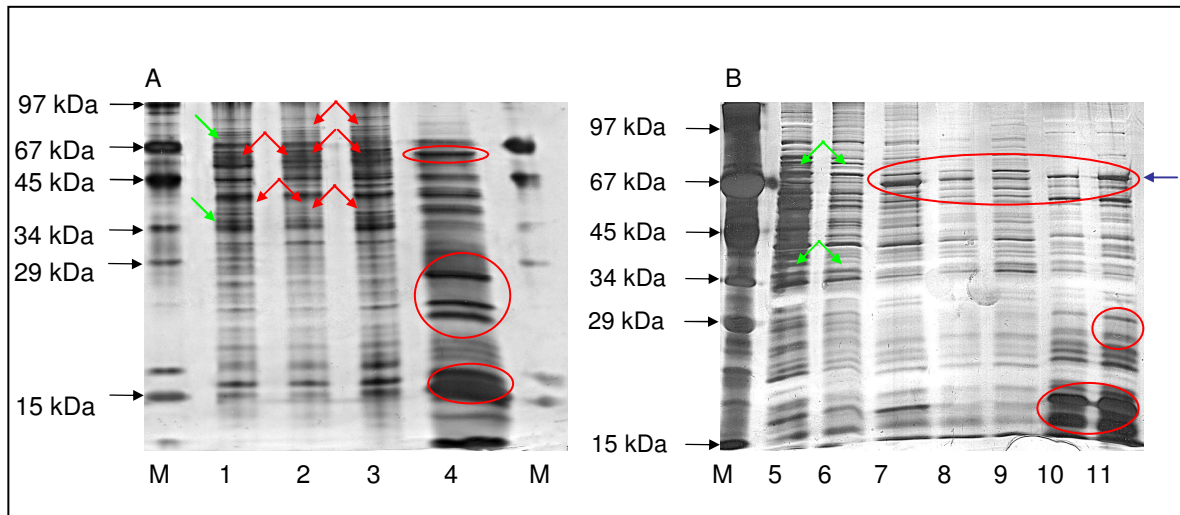


Abbildung 18: Proteinmustervergleich von *Paracoccus* sp. IO-1 bei Wachstumsversuchen mit D5 als Substrat. Eindimensionale Auftrennung (Kap. III, 7.3.1) von Zellextrakten von *Paracoccus* sp. IO-1 nach Anzucht unter denitrifizierenden Bedingungen. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silber gefärbt. A Spur 1: Acetat anaerob; Spur 2: Butyrat anaerob; Spur 3: Isobutyrtat anaerob, Spur 4: D5 (Fermenter I). B Spur 5: Acetat aerob; Spur 6: Acetat anaerob; Spur 7: Zellen aus der Ölphase (Fermenter II), Tag 67; Spur 8: Zellen aus der Ölphase nach 2. Lysozymaufschluß (Fermenter II), Tag 67; Spur 9: Zellen aus der wässrigen Phase, Tag 67 (Fermenter II); Spur 10: Zellen aus der wässrigen Phase (Fermenter II), Tag 28; Spur 11: Zellen aus der wässrigen Phase (Fermenter II), Tag 41.

Ein konserviertes Proteinmuster (Abb. 18: induzierte Banden bei 15kDa, 25 kDa und 67 kDa in rot markiert) ist bei den Zellen aus beiden Fermentern zu erkennen. Offenbar wurden in beiden Fermentern also viele identische Proteine induziert. Zum Vergleich wurden Zellen aerob und anaerob auf Acetat als einzigem Substrat angezogen (Abb. 18: Spuren 1, 5 und 6) und in den Gelen aufgetrennt. Sowohl in den Zellen aus den Fermentern als auch bei den Kontrollen treten dabei Proteine auf, die in der jeweiligen Vergleichsprobe fehlen (Abb. 18: induzierte Proteine bei 34 kDa und 67 kDa, hellgrüne Pfeile). Daher ist davon auszugehen, dass beim (mikroaeroben) Wachstum mit dem Siloxan D5 die Synthese einiger Proteine induziert wurde. Im Gegensatz dazu sind wieder andere Proteine bei Zellen induziert, die mit Acetat als einzigem Substrat gewachsen sind. Größere Unterschiede der Proteinmuster sind bei Zellen zu beobachten, die anaerob auf weiteren unterschiedlichen Substraten gewachsen sind (Abb. 11, bei 40 kDa, 67 kDa und 97 kDa; Spur 1, 2 und 3; rote Pfeile). Beim Vergleich der Proteinmuster der Zellen aus Fermenter I und II zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt sich folgendes Bild: Das Proteinmuster der Zellen aus Fermenter I am Ende des Versuchs (Abb. 18: Spur 4) ist zu dem Proteinmuster der Zellen aus Fermenter II zu frühen Zeitpunkten (Abb. 18: Spuren 10 und 11)

sehr ähnlich. Allerdings ändert sich bei den Zellen aus Fermenter II zu späteren Zeitpunkten das Proteinmuster der Zellen und ähnelt dann mehr dem Muster von Zellen, die auf Acetat gewachsen sind (Abb. 18: Tag 67, Spuren 7-11). Anscheinend gibt es darüber hinaus auch Unterschiede des Proteinmusters von Zellen der wässrigen Phase (Spur 9) und der Ölphase (Abb. 18: Spur 7 und 8). Bei den Zellen aus der wässrigen Phase ähnelt das Proteinmuster eher dem der Kontrollzellen auf Acetat (Abb. 18: blauer Pfeile und rote Markierung), während das Proteinmuster der Zellen aus der Ölphase die induzierten Banden aufweist, die auch in den frühen Proben (Abb. 18: Spur 10 und 11) des Fermenters II und in den Zellen des Fermenter I zu finden sind.

Über einen proteomischen Ansatz nach zweidimensionaler Auftrennung der Proteine wurden anschließend einige der Siloxan-induzierten Proteine identifiziert (Kap. IV, 6).

2.7 Toxizität und minimale Hemmkonzentration von Silanolen

2.7.1 Toxische Wirkung von DMSD und M3 auf das Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1

Um die bakterizide Wirkung der Silanole auf das Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1 zu bestimmen, wurden Flüssigkulturen mit Acetat als Substrat angezogen. Mit diesem Inokulum wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen der Silanole DMSD und M3 angesetzt und Verdünnungsstufen ausplattiert. Die Anzahl der lebenden Kolonien wurde durch Auszählen ermittelt (Kim und Baney 2007)

Toxizität von DMSD: Im Vergleich zur Negativkontrolle, die kein Silanol enthielt, konnte keine toxische Wirkung von 1 mM DMSD (Abb. 19) auf das Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1 festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 10 mM DMSD überlebten im Vergleich zur Negativkontrolle nur noch 74 % der Bakterien. DMSD scheint also in dieser Konzentration für *Paracoccus* sp. IO-1 leicht toxisch zu sein.

Toxizität von M3: Eine toxische Wirkung auf das Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1 konnte bei keiner der getesteten Konzentrationen von M3 (0-200 mM) festgestellt werden (Abb. 19).

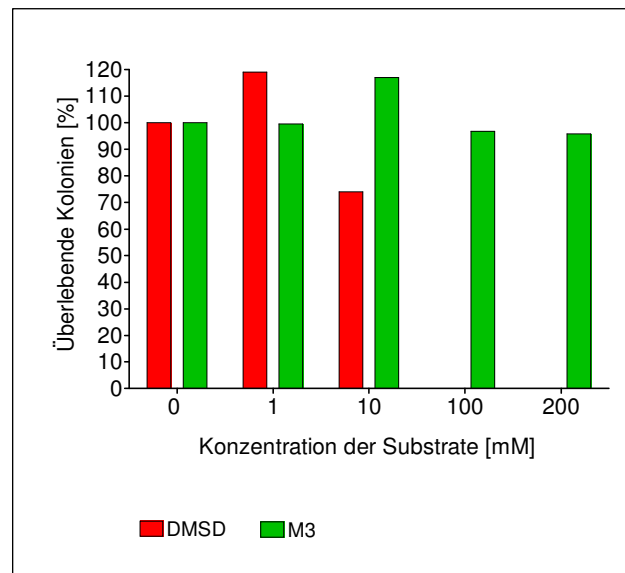


Abbildung 19: Toxizität der Substrate DMSD und M3 beim Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1. Die Zahl der überlebenden Kolonien des Kontrollansatzes ohne Silanol wurden als 100 % gesetzt und der Anteil in den übrigen Ansätzen entsprechend berechnet. DMSD konnte nur bis zu einer Konzentration von 10 mM eingesetzt werden, da es bei höheren Konzentrationen polymerisiert.

2.7.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK) von DMSD und M3 für *Paracoccus* sp. IO-1

Die minimale Hemmkonzentration gibt diejenige Konzentration eines Stoffes an, die ausreicht, um das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe (Konzentrationen 0 mM, 0,156 mM, 0,3125 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM) der zu testenden Substrate (DMSD, Trimethylsilanol, *tert*-Butanol und Methanol) in Grundmedium I (Kap. III, 3.1.1) angesetzt, das zusätzlich noch 10 mM Acetat als Kohlenstoffquelle-Quelle enthielt.

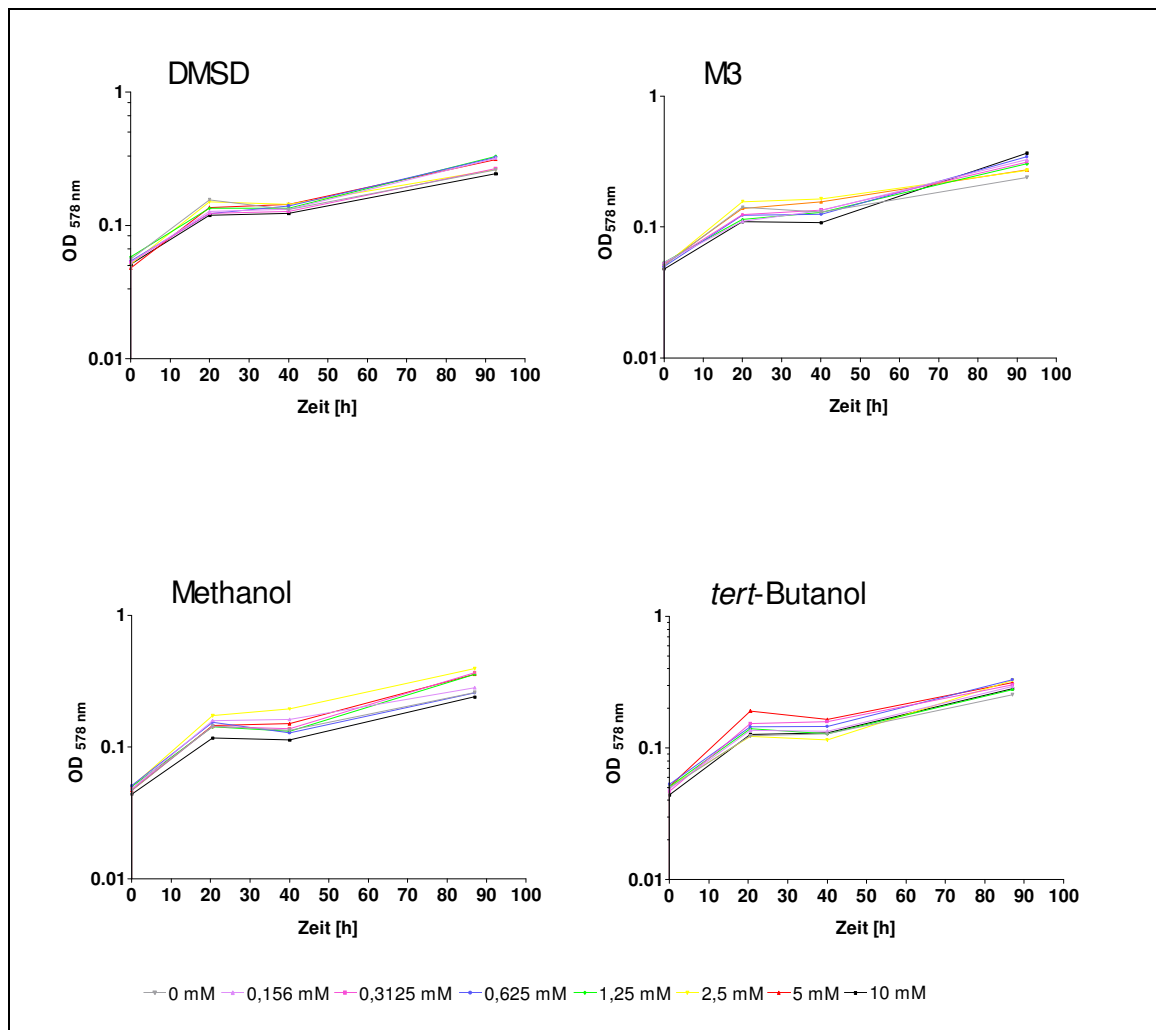


Abbildung 20: Wachstumskurven von *Paracoccus* sp. IO-1 beim Wachstum mit 10 mM Acetat und den zu testenden Substanzen DMSD, Trimethylsilanol, *tert*-Butanol und Methanol in den Konzentrationen 0 mM, 0,156 mM, 0,3125 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM. Dargestellt ist die Zunahme der Optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit [h].

Das Wachstum von *Paracoccus* sp. IO-1 wurde von keinem der Substrate DMSD, Trimethylsilanol, *tert*-Butanol und Methanol in den getesteten Konzentrationen gehemmt (Abb. 20). Alle Ansätze erreichten nahezu dieselbe OD von 0,3 nach 96 h.